

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-047299

(43)Date of publication of application : 12.02.2002

(51)Int.Cl.

C07K 14/49  
A61K 35/14  
A61K 38/22  
A61P 17/02  
A61P 43/00  
C07K 1/34  
C07K 14/47

(21)Application number : 2000-227034

(71)Applicant : TERUMO CORP

(22)Date of filing : 27.07.2000

(72)Inventor : HARADA KAZUMICHI  
OMURA YOSHITAKA

(54) PLATELET RELEASING FACTOR FREE FROM PLATELET ACTIVATION AGENT AND METHOD FOR PREPARATION OF THE FACTOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for the quick preparation of a platelet releasing factor free from extraneous platelet activation agent, etc. with a simple procedure while suppressing the contamination risk with bacteria and foreign matters and provide a platelet releasing factor produced by this method and free from extraneous platelet activation agent, etc.

SOLUTION: The method for the preparation of a platelet releasing factor comprises the transfer of a platelet-containing suspension through a filter capable of catching the platelet, bringing the filter holding the platelet with an aqueous solution free from platelet activation agent and activating the platelet with the aqueous solution. The platelet releasing factor free from platelet activation agent is produced by the above method.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-47299  
(P2002-47299A)

(43) 公開日 平成14年2月12日 (2002. 2. 12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 K 14/49		C 0 7 K 14/49	4 C 0 8 4
A 6 1 K 35/14		A 6 1 K 35/14	Z 4 C 0 8 7
38/22		A 6 1 P 17/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 17/02		43/00	1 0 7
43/00	1 0 7	C 0 7 K 1/34	
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-227034(P2000-227034)

(22) 出願日 平成12年7月27日 (2000. 7. 27)

(71) 出願人 000109543

テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号

(72) 発明者 原田 和道

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

(72) 発明者 大村 佳孝

神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地

テルモ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板活性化剤を含まない血小板放出因子及びこの調製方法

(57) 【要約】

【課題】短時間で、簡単な操作で、細菌や異物による汚染の機会が少なく、更に外来の物質である血小板活性化剤等が共存していない血小板放出因子を調製する方法の提供およびこの方法によって得られる外来の物質である血小板活性化剤等が共存していない血小板放出因子を提供すること。

【解決手段】血小板を含む懸濁液を血小板を保持できるフィルターに通液し、血小板を該フィルターに保持させた後、該フィルターに血小板活性化剤を含んでいない水溶液を接触させ、該水溶液によって血小板を活性化させることで血小板放出因子を調製する方法およびこの方法によって得られる血小板活性化剤を含まない血小板放出因子。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】血小板を含む懸濁液を血小板を保持できるフィルターに通液し、血小板を該フィルターに保持させた後、該フィルターに血小板活性化剤を含んでいない水溶液を接触させ、該水溶液によって血小板を活性化させることによって得られる血小板活性化剤を含まない血小板放出因子。

【請求項 2】血小板を含む懸濁液を血小板を保持できるフィルターに通液し、血小板を該フィルターに保持させた後、該フィルターに血小板活性化剤を含んでいない水溶液を接触させ、該水溶液によって血小板を活性化させて血小板放出因子を得る、血小板活性化剤を含んでいない血小板放出因子の調製方法。

【請求項 3】前記フィルターがゼータ電位が正值のフィルターである請求項 1 または 2 に記載の血小板放出因子及び血小板放出因子の調製方法。

【請求項 4】前記ゼータ電位が正值のフィルターがフィルター材の表面にアルコキシルアルキル（メタ）アクリレートと塩基性官能基を有するアクリル酸のアルキルアミンエステルの共重合体を導入したフィルターである請求項 3 に記載の血小板放出因子及び血小板放出因子の調製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、創傷治癒の促進等の目的で使用される血小板放出因子及びその調製方法に関する。更に詳しくは血小板活性化剤を含んでいない血小板放出因子及び血小板活性化剤を含んでいない血小板放出因子の調製方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】皮膚潰瘍や褥創の治療には、壊死組織を除去し細菌の感染をおさえる処置をしつつ患者自身の自然治癒力により肉芽の形成、表皮の再生を期待する方法が従来用いられてきた。

【0003】近年になって、生化学、分子生物学の進歩、創傷治癒のメカニズムの研究の進展とともに、サイトカインや細胞増殖因子が創傷治癒過程において機能していることが明らかになりつつある。これらサイトカインや細胞増殖因子の治療への応用が模索されており、実際の治療でも利用されはじめている。しかし、サイトカインや細胞増殖因子は創傷部の治癒過程において複雑なネットワークの中で制御され機能しており、単独のサイトカインや細胞増殖因子の投与による治癒の促進は依然限界がある。

【0004】一方、コラーゲン、キチン、キトサン、フィブリンなどのマトリックスは創傷部の治癒促進効果をもつことが知られており、コラーゲンなどからなる創傷被覆剤が熱傷、外科手術後の欠損創等の治療に使用されている。褥創など難治性の皮膚疾患の治療にもコラーゲン、キチンなどを利用した被覆剤などが使用されている

が、高齢者、糖尿病患者等で生体の創傷治癒力が衰えている場合には治癒促進効果は十分とはいえない。

【0005】ところで、血小板中には血小板由来成長因子 (PDGF)、トランスフォーミング成長因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、上皮成長因子 (EGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、血小板第 4 因子、 $\beta$ -トロンボグロブリンなど、細胞増殖因子を含む生物活性を有する分子が含まれていることが明らかにされ、血小板を活性化することにより血小板から放出される前述の分子（血小板放出因子）よりなる組成物の創傷治療への応用も試みられ成果をおさめている。特に創傷部での血行が不十分な症例では、本来、血液の供給があれば、血漿成分の漏出と血小板の凝集による治癒の誘導を、外来的に血小板放出因子を創傷部へ濃縮して供給することにより治癒効果を発揮している。

【0006】しかし、血小板放出因子の製造法については遠心操作、液層の分離を含む長時間を要する方法によっている。この方法で血小板の損失を少なくするには、熟練を要する操作が必要であり、また開放した系で行うため異物混入、微生物による汚染等の危険にもさらされている。この血小板放出因子の製造法に関して、製造の簡便化を図る方法がイノテブ社により開示されている

（特表平7-507558）。この開示された方法では、フィルター上に血小板を保持し、その後外来的に活性化剤を加えて、フィルター上で血小板を活性化させ、血小板放出因子を含む溶液を濾液として回収している。従来法に比べて、製造に要する時間の短縮と装置を閉鎖系にすることにより汚染等の危険の低減を図っているが、外来的に活性化剤を使用する必要がある、もっとも好ましい活性化剤であるトロンビンを追加する場合でも、その由来が異なる動物種あるいは組み換え体による抗原性、また創傷治癒促進剤製造に関わるコストの面からも最良とは言えなかった。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】上記のように従来の血小板放出因子の調製方法では長い時間を要したり、クローズドでの操作が行い難く細菌などの異物による汚染が起きる危険性があったり、またクローズドで操作が行えても、血小板活性化剤等の不要物質が混在していたりして、折角血小板放出因子を調製しても使用し難い物しか取得できなかった。

【0008】従って、本発明は、短時間で、簡単な操作で、細菌や異物による汚染の機会が少なく、更に外来の物質である血小板活性化剤等が共存していない血小板放出因子を調製する方法を提供することを目的としている。また、本発明は、前記の方法によって得られる外来の物質である血小板活性化剤等が共存していない血小板放出因子を提供することを目的としている。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決し目的を

達成するために本発明では、血小板を含む懸濁液を血小板を保持できるフィルターに通液し、血小板を該フィルターに保持させた後、フィルターに血小板活性化剤を含んでいない水溶液を接触させ、水溶液によって血小板を活性化させることによって得られる血小板活性化剤を含まない血小板放出因子を提供するものである。

【0010】また、本発明は血小板を含む懸濁液を血小板を保持できるフィルターに通液し、血小板をフィルターに保持させた後、フィルターに血小板活性化剤を含んでいない水溶液を接触させ、水溶液によって血小板を活性化させて血小板放出因子を得る、血小板活性化剤を含んでいない血小板放出因子の調製方法を提供するものである。

【0011】更に、使用するフィルターがゼータ電位が正值のフィルターである血小板放出因子及び血小板放出因子の調製方法を提供するものである。更にまた、使用するゼータ電位が正值のフィルターがフィルター材の表面にアルコキシル(メタ)アクリレートと塩基性官能基を有するアクリル酸のアルキルアミンエステルの共重合体を導入したフィルターである血小板放出因子及び血小板放出因子の調製方法を提供するものである。

#### 【0012】

【発明の実施の形態】以下に本発明の好適な実施の形態を示し、更に詳細に説明する。本発明は、血小板を含む懸濁液中から血小板因子を含む創傷治癒促進剤を取り出すためのものであり、フィルターに血小板を含む懸濁液を通液し、フィルターに血小板を保持させた後、水溶液と接触させて物理的な刺激等を加えて、血小板活性化剤を含まない血小板放出因子を取得するものである。

【0013】本発明において、血小板とは、ヒトあるいは動物由来の血小板を指し、特に自己の血小板、すなわち創傷治癒促進剤を使用する本人のものが好ましい。自己の血小板である場合には、微生物等による新たな感染の危険を低減でき、安全に治癒が促進できる。血小板を含む懸濁液は、例えば、採取した血液にACD溶液、CPD溶液、ヘパリン等の抗凝固剤を加えた血液、あるいは遠心分離法、ゲル濾過法などを用いて分離した血小板懸濁液、また、培養された血小板を懸濁した溶液でもよい。

【0014】本発明においてフィルターとは液体の流入口と流出口を有するハウジング内にフィルター材を配置・固定したものである。フィルター材はその赤血球等の血球が通過できる連続した孔を有したものであり、多孔質体、中空糸等を使用したもの、あるいはハウジング内にビーズ、粉体等を充填したものが使用できる。多孔質体とは内部または表面に多数の小さな外部に通じる連続した孔状を持つ物質のことである。つまり、血球が通過できる孔を有していればよく、多孔質体には高分子繊維、高分子繊維マトリックス、高分子膜、固体多孔質体等を用いることができる。フィルター材の連続した孔の平均径が5〜20 $\mu\text{m}$ であることが望ましい、フィルタ

ー材はフィルター内で支持体等によって固定されていて、液体の通過に伴ってフィルター材がフィルターから流出することのない構造となっている。

【0015】本発明に使用するフィルター材は、材料表面に塩基性官能基を結合させることによりフィルター材のゼータ電位が正值となっていることが好ましい。このフィルター材表面の処理を工夫することにより、血小板の捕捉の過程および洗浄の過程において血小板の活性化による顆粒中因子の放出を誘導することなく保持することが可能となる。血小板の活性化による顆粒中因子の放出を誘導することなく、血小板を保持できるフィルターであれば本発明の方法に使用可能であるが、保持後の物理的刺激による血小板因子の回収の効率から、アルコキシル(メタ)アクリレートと、塩基性官能基を有するアクリル酸のアルキルアミンエステルを有する共重合体を表面に導入した濾材の使用が望ましい。

【0016】前記アルコキシル(メタ)アクリレートを構成成分とする重合体は、以下のアルコキシル(メタ)アクリレートの1種または2種以上の単量体とこれと共重合しうる塩基性官能基を有するモノマーとの共重合体である。

【0017】アルコキシル(メタ)アクリレートとしては、メトキシメチル(メタ)アクリレート、メトキシエチル(メタ)アクリレート、メトキシプロピル(メタ)アクリレート、メトキシブチル(メタ)アクリレート、エトキシメチル(メタ)アクリレート、エトキシエチル(メタ)アクリレート、エトキシプロピル(メタ)アクリレート、エトキシブチル(メタ)アクリレート、プロポキシメチル(メタ)アクリレート、プロポキシエチル(メタ)アクリレート、プロポキシプロピル(メタ)アクリレート、プロポキシブチル(メタ)アクリレート等があり、このうち経済性や操作性の点からメトキシアクリレートが好ましい。さらに、特にメトキシエチルアクリレートが好ましい。

【0018】アルコキシル(メタ)アクリレートと共重合し得る塩基性官能基を有するモノマーにおいて、その塩基性官能基としては、第1級アミノ基、第2級アミノ基、第3級アミノ基、4級アンモニウム塩、ピリジル基、アジリジン基およびイミダゾール基が挙げられる。これらの官能基を有する具体的なモノマーとしては以下のものが挙げられる。アミノアルキル(メタ)アクリレートならびにアミノアルキル(メタ)アクリルアミドとしては、例えば、アミノメチル(メタ)アクリレート、アミノエチル(メタ)アクリレート、アミノイソプロピル(メタ)アクリレート、アミノノルマルブチル(メタ)アクリレート、N-メチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N-エチルアミノイソブチル(メタ)アクリレート、N-イソプロピルアミノメチル(メタ)アクリレート、N-イソプロピルアミノエチル(メタ)アクリレート、N-ノルマルブチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N-ターシャリブチルアミノエチル(メ

タ)アクリレート、N,N-ジメチルアミノメチル(メタ)アクリレート、N,N-ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N,N-ジメチルアミノプロピル(メタ)アクリレート、N,N-ジメチルアミノブチル(メタ)アクリレート、N-メチル-N-エチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N-メチル-N-ブチルアミノエチルアクリレート、N,N-ジエチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N,N-ジエチルアミノプロピル(メタ)アクリレート、N,N-ジプロピルアミノエチル(メタ)アクリレート、N,N-ジプロピルアミノプロピル(メタ)アクリレート、N,N-ジアミノブチルプロピル(メタ)アクリレートなどの(メタ)アクリル酸エステルおよびこれらに相当する(メタ)アクリルアミド、また、アミノスチレン、N,N-ジメチルアミノスチレン、N,N-ジエチルアミノスチレン、ビニルピリジン、N-メチル-N-ビニルピリジン、N-エチル-N-ビニルピリジン、ビニルキノリン、エチレンイミン、プロピレンイミン、N-アミノエチルエチレンイミン、ビニルイミダゾール、ビニルピラゾリン、ビニルピラジン、および上記の化合物をハロゲン化アルキル、硫酸化アルキル等によって4級アンモニウム塩とした誘導体等を挙げることができる。

【0019】モノマーは、得られる重合体の血小板の捕捉能力と保持後の活性化の効率が損なわれない程度の組成比で使用される。本発明におけるアルコキシアルキルアクリレート共重合体中の塩基性官能基を有するモノマーの含有割合は90~10モル%、好ましくは80~20モル%である。塩基性官能基を有するモノマーが10モル%未満では、血小板の補足率が低すぎる。一方、90モル%を超えると、濾過時の血液細胞膜への損傷が大きくなり溶血の可能性を伴うために、該共重合体はそのままでは使用できない。

【0020】本発明の共重合体は、ランダム共重合体、ブロック共重合体、グラフト共重合体のいずれでも良く、該重合体を製造するための重合反応それ自体には特別の制限はなく、ラジカル重合やイオン重合や光重合、マクロマーを利用した重合等の公知の方法で使用できる。

【0021】該共重合体をフィルター表面に保持させる方法としては、コーティング法、放射線、電子線および紫外線によるグラフト重合、基材の官能基との化学反応を利用して導入する方法等の公知の方法がある。この中でも特にコーティング法は製造操作が容易であるため、実用上好ましい。さらにコーティング方法についても、塗布法、スプレー法、ディップ法等があるが、特に制限なくいずれも適用できる。

【0022】本発明における血小板活性化剤を含まない水溶液である洗浄回収液には、HEPES緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、生理食塩水等の生化学的に用いられ、それ自体では血小板を活性化させない溶液を用いることができる。また前記水溶液の浸透圧を変化させた

ものなど、血小板の形態変化等を誘導する程度で顆粒中因子の放出には至らない水溶液も使用可能である。さらに洗浄回収液には血漿成分、アルブミン等を添加することは活性成分の消失を防ぐ意味等で好ましい。

【0023】本発明の創傷治癒促進剤は上記したフィルターを含む装置に血小板を含む細胞懸濁液を通液させ、血小板を保持させたフィルターに物理的刺激を加えたのち溶液を回収することにより製造される。

【0024】本発明の装置は容易に閉鎖系の形を取ることができるよう設計することが好適である。閉鎖系の装置に特に限定されるわけではないが、製造途中での微生物による汚染、製造を行う際の感染等の危険を低減できるので閉鎖系の装置が望ましい。

【0025】本発明における物理的刺激とは、血小板を保持したフィルター材に液体、気体、ゲル等を通過させることによるシェアストレス、接触する水溶液の組成変化による浸透圧変化あるいは水素イオン濃度変化等による刺激、物理的に血小板を保持したフィルター材を圧縮あるいは変形させることによる刺激、血小板を保持したフィルター材を含むフィルターを密封下で陰圧、あるいは陽圧にすることによる圧力変化による刺激、固体で血小板を保持した濾材を摩擦あるいは剪断、穿孔する刺激、血小板を保持したフィルター材にソニケーション等の振動を加える刺激、血小板を保持したフィルター材に温度変化を与える刺激、血小板を保持したフィルター材に電磁波、音波、衝撃波等を加える刺激等、血小板から顆粒中因子の放出を誘導できるものを意味する。

【0026】本発明における装置は既存の血球分離技術と容易に組み合わせる形を取ることが可能であり、例えば白血球除去フィルターを流入口の上流、あるいはハウジング内でフィルターの上流に配置することも實際上可能である。また、流出口下流に、細胞を除く、あるいは滅菌するフィルター等を配置することも可能である。

【0027】本発明による方法で製造された創傷治癒促進剤は虚血性創傷、褥創などの難治性の創傷、火傷など、色々な疾患の治療に用いるが、特に限定されるわけではなく通常の治療の過程で、外科的あるいは内科的に血小板凝集の観察される創部、組織の再形成部位に適用される。またさらに効果的には血行の不足している創部、血流があればより効率的に再形成が促される組織に適用されることにより、その治療、再形成を促進する。また血小板そのもの、あるいはPDGF等血小板顆粒中因子が効果を示す疾患にも有効である。創部に適用する際には本発明による創傷治癒促進剤を溶液で塗布することによっても治療が促進されるが、適用の形態は例えば懸濁剤、乳剤、ペースト剤等を用いることができる。より効果的に行うには例えばガーゼに染み込ませて創部を覆う、あるいは創傷被覆剤に含有させて適用してもよい。創傷被覆剤の材質はコラーゲン、キチン、キトサン、フィブリン等公知のものを使用することができる

が、特に限定されるものではない。

【0028】

【実施例】以下に本発明の実施例を説明する。

【0029】（実施例1）メトキシエチルアクリレート20gおよびジメチルアミノエチルメタクリレート（東京化成）6gにアゾビスイソブチロニトリルをモノマーの0.1重量%添加し、ジメチルホルムアミド（関東化学）120g中で75℃、8時間重合を行った。重合反応終了後、反応液をn-ヘキサンに滴下し沈殿させ、生成物を分離した。生成物をテトラヒドロフランに溶解し、n-ヘキサンに滴下し、2回精製を行った。精製物を一昼夜減圧乾燥した。この表面処理剤をメタノールに溶解し、ウレタン多孔質体にコーティングした。

【0030】（実施例2）健康人ボランティアより血液を採取し、採血した血液にACD溶液を血液量50mlあたり7ml加えた。この抗凝固剤添加血液10mlをフィルターハウジング中に設置した実施例1で作成したカチオン化ポリウレタン多孔質体に通液し、通過血液を回収し

表1	PDGF-AB濃度(ng/ml)	$\beta$ -TG濃度(ng/ml)
通過前血液	5.4	624.9
通過血液	1.0	504.7
洗浄液	2.3	399.1
回収液	71.5	7992.0
血小板捕捉率	92.18%	

【0032】表1より本発明の方法により、ACD溶液添加血液中から血小板がカチオン化多孔質体に保持され、血液を通過させ保持させる過程、洗浄する過程では血小板が活性化されず、血小板が保持されたフィルターに回収液を流通させるシェアストレスを加えることにより血小板の活性化が誘導され、血小板顆粒中に含まれる因子が回収されたことが示された。

【0033】（実施例3）健康人ボランティアより血液を採取し、採血した血液にACD溶液を血液量50mlあたり7ml加えた。この抗凝固剤添加血液10mlをフィルターハウジング中に設置した実施例1で作成したカチオン化ポリウレタン多孔質体に通液し、通過血液を回収した。次にフィルターに3mlのダルベッコ変法PBSを通液しフィルター内の血漿成分の洗浄を行いこの溶液も回収した。流出口側に空のシリンジを装着、流入口にダル

た。次にフィルターに3mlのHEPES緩衝液を通液しフィルター内の血漿成分の洗浄を行いこの溶液も回収した。流出口側に空のシリンジを装着、流入口にHEPES緩衝液1mlが入ったシリンジを装着し流入口側のシリンジ内の溶液を約1ml/秒の流速でフィルター内を通過させ、流出口側のシリンジ内に溶液を回収、次に流出口側のシリンジ内の溶液を同様にフィルター内を通過させ流入口側のシリンジに回収、この操作を交互に計15回行った後溶液を回収した。通過血液について血小板数を全自動血球数測定器で計測した。

【0031】また、血小板の活性化により血小板顆粒より放出される因子の量について、通過血液、洗浄液、回収液中に含まれるPDGF-AB、 $\beta$ -トロポグロブリンの濃度を測定した。表1にカチオン化ポリウレタン多孔質体の血小板捕捉率(%)、各溶液中のPDGF-AB、 $\beta$ -トロポグロブリン濃度(ng/ml)を表1に示した。

【表1】

ベッコ変法PBS1mlが入ったシリンジを装着し流入口側のシリンジ内の溶液を約1ml/秒の流速でフィルター内を通過させ、流出口側のシリンジ内に溶液を回収、次に流出口側のシリンジ内の溶液を同様にフィルター内を通過させ流入口側のシリンジに回収、この操作を交互に計15回行った後溶液を回収した。通過血液について血小板数を全自動血球数測定器で計測した。

【0034】また、血小板の活性化により血小板顆粒より放出される因子の量について、通過血液、洗浄液、回収液中に含まれるPDGF-AB、 $\beta$ -トロポグロブリンの濃度を測定した。表2にカチオン化ポリウレタン多孔質体の血小板捕捉率(%)、各溶液中のPDGF-AB、 $\beta$ -トロポグロブリン濃度(ng/ml)を表2に示した。

【表2】

表2	PDGF-AB濃度(ng/ml)	$\beta$ -TG濃度(ng/ml)
通過前血液	5.4	624.9
通過血液	1.5	464.7
洗浄液	1.6	238.9
回収液	66.6	8181.4
血小板捕捉率	91.33%	

【0035】表2より本発明の方法により、ACD溶液添加血液中から血小板がカチオン化多孔質体に保持され、血液を通過させ保持させる過程、洗浄する過程では血小板が活性化されず、血小板が保持されたフィルターに回収液を流通させるシェアストレスを加えることにより血

小板の活性化が誘導され、血小板顆粒中に含まれる因子が回収されたことが示された。

【0036】（実施例4）健康人ボランティアより血液を採取し、採血した血液にACD溶液を血液量50mlあたり7ml加えた。この抗凝固剤添加血液10mlをフィルタ

ーハウジング中に設置した実施例1で作成したカチオン化ポリウレタン多孔質体に通液し、通過血液を回収した。次にフィルターに3mlの生理食塩水を通液しフィルター内の血漿成分の洗浄を行いこの溶液も回収した。流出口側に空のシリンジを装着、流入口に生理食塩水1mlが入ったシリンジを装着し流入口側のシリンジ内の溶液を約1ml/秒の流速でフィルター内を通過させ、流出口側のシリンジ内に溶液を回収、次に流出口側のシリンジ内の溶液を同様にフィルター内を通過させ流入口側のシリンジに回収、この操作を交互に計15回行った後溶液

を回収した。通過血液について血小板数を全自動血球数測定器で計測した。また、血小板の活性化により血小板顆粒より放出される因子の量について、通過血液、洗浄液、回収液中に含まれるPDGF-AB、 $\beta$ -トロンボグロブリンの濃度を測定した。表3にカチオン化ポリウレタン多孔質体の血小板捕捉率(%)、各溶液中のPDGF-AB、 $\beta$ -トロンボグロブリン濃度(ng/ml)を表3に示した。

【表3】

表3	PDGF-AB濃度(ng/ml)	$\beta$ -TG濃度(ng/ml)
通過前血液	5.4	293.5
通過血液	0.5	198.8
洗浄液	0.9	238.9
回収液	58.6	8050.3
血小板捕捉率	95.14%	

【0037】表3より本発明の方法により、ACD溶液添加血液から血小板がカチオン化多孔質体に保持され、血液を通過させ保持させる過程、洗浄する過程では血小板が活性化されず、血小板が保持されたフィルターに回収液を流通させるシェアストレスを加えることにより血小板の活性化が誘導され、血小板顆粒中に含まれる因子が回収されたことが示された。

【0038】(比較例1) 健康人ボランティアより血液を採取し、採血した血液にACD溶液を血液量50mlあたり7ml加えた。この抗凝固剤添加血液10mlをフィルターハウジング中に設置した実施例1で作成したカチオン化ポリウレタン多孔質体に通液し、通過血液を回収し

た。次にフィルターに3mlの生理食塩水を通液しフィルター内の血漿成分の洗浄を行ったのち、フィルター内に2U/mlの濃度となるトロンビン添加生理食塩水を充填し室温10分間放置後溶液を回収した。血小板の活性化により血小板顆粒より放出される因子の量について、回収液中に含まれるPDGF-AB、 $\beta$ -トロンボグロブリンの濃度を測定した。

【0039】表4に抗凝固剤添加血液10mlから調製した血小板放出物中のPDGF-AB、 $\beta$ -トロンボグロブリン量を実施例2、3、4と比較して示した。

【表4】

表4	PDGF-AB量(ng)	$\beta$ -TG量(mg)
実施例2	178.7	20.0
実施例3	166.5	20.5
実施例4	146.6	20.1
比較例1	193.1	20.2

本発明の方法において活性化剤の添加による方法とほぼ同量の血小板顆粒中に含まれる因子が回収される事が示された。

【0040】(実施例5) 健康人ボランティアより血液を採取し、採血した血液にACD溶液を血液量50mlあたり7ml加えた。この抗凝固剤添加血液10mlをフィルターハウジング中に設置した実施例1で作成したカチオン化ポリウレタン多孔質体に通液し、次にフィルターに5mlの生理食塩水を通液しフィルター内の血漿成分の洗浄を行った後、流出口側に空のシリンジを装着、流入口に生理食塩水が入ったシリンジを装着し流入口側のシリンジ内の溶液を約1ml/秒の流速でフィルター内を通過させ、流出口側のシリンジ内に溶液を回収、次に流出口側のシリンジ内の溶液を同様にフィルター内を通過させ流入口側のシリンジに回収、この操作を交互に計15回行った後溶液を回収し、創傷治癒促進剤とした。

【0041】(比較例2) 健康人ボランティアより血液を採取し、採血した血液にACD溶液を血液量50mlあたり7ml加えた。この抗凝固剤添加血液10mlをフィルターハウジング中に設置した実施例1で作成したカチオン化ポリウレタン多孔質体に通液し、通過血液を回収した。次にフィルターに5mlの生理食塩水を通液しフィルター内の血漿成分の洗浄を行ったのち、フィルター内に2U/mlのトロンビン添加生理食塩水を充填し室温10分間放置後溶液を回収し、創傷治癒促進剤とした。

【0042】(比較例3) 健康人ボランティアより血液を採取し、採血した血液にACD溶液を血液量50mlあたり7ml加えた。この抗凝固剤添加血液から特表平5-500516号記載の方法により創傷治癒促進剤を調製した。

【0043】(実施例6) 実施例5、比較例2および3で製造した創傷治癒促進剤について、マウス線維芽細胞の増殖促進活性を検討した。マウス線維芽細胞を96孔

プレート（コーニング社製）中に3000個蒔き、0.5%FBSを含むDME培地で16時間培養後、各創傷治癒促進剤を15倍、45倍、135倍、405倍の希釈倍率となるように添加し、3日間培養を続けた。陽性コントロールは10%FBSで培養を行った。培養後の細胞数の測定は、培養液にXTT試薬（ロッシュダイアグノスティック社製）を50 $\mu$ l加え数時間インキュベート後、450nmの吸収を測定した。図1に示すように、実施例5において製造した創傷治癒促進剤に、既報によるものと同等の増殖促進活性が認められた。

#### 【0044】

【発明の効果】以上に詳述したように本発明は、血小板を含む懸濁液を血小板を保持できるフィルターに通液し保持させた後、血小板活性化剤を含んでいない水溶液を

接触させることによって得られる血小板活性化剤を含まない血小板放出因子及びその製造法であるため、簡単な操作で短時間の内に血小板放出因子が得られ治療に用いることができる。また、クローズドで操作が行えるため、細菌や異物による汚染の機会が少なく、安心して使用できる血小板放出因子を得ることができる。

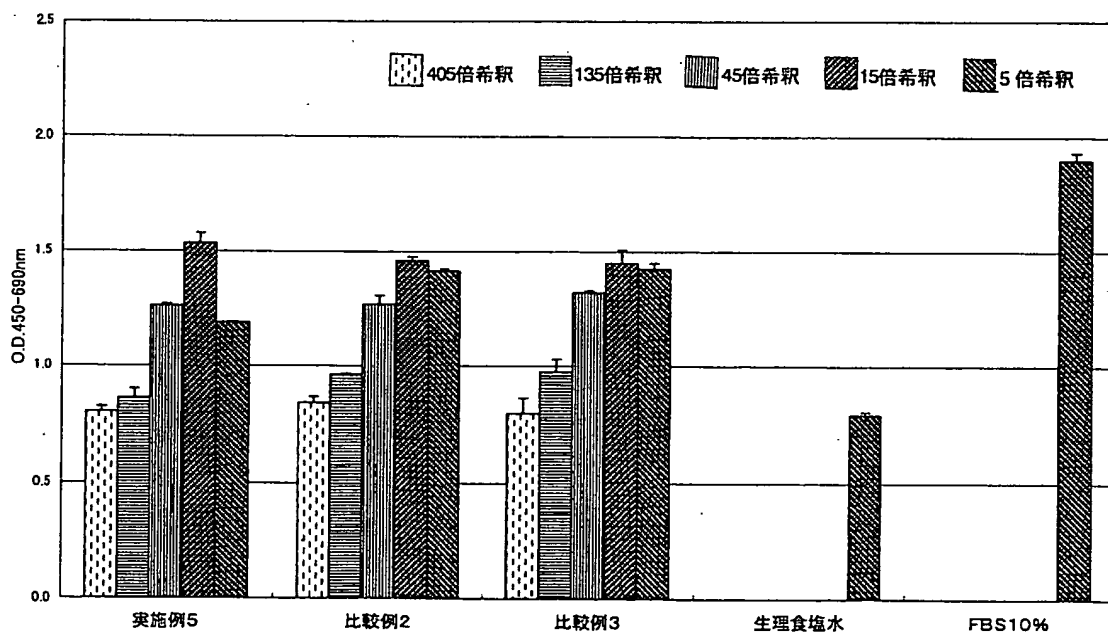
【0045】更に本発明の大きな特徴は、外来の物質である血小板活性化剤等が共存していない血小板放出因子を調製することができ、血小板活性化剤等による免疫反応を心配することなく調製した血小板放出因子を得ることができることである。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】マウス線維芽細胞増殖促進活性を示すグラフである。

【図1】

図1 マウス線維芽細胞増殖促進活性



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C07K 1/34

14/47

識別記号

FI

C07K 14/47

A61K 37/24

テーマコード (参考)



F ターム(参考) 4C084 AA02 AA06 AA07 BA44 CA26  
DB55 NA03 NA06 ZA892  
ZB222 ZC482  
4C087 AA01 AA02 AA04 BB38 DA03  
DA21 MA63 NA06 NA07 ZA53  
ZA89 ZC41  
4H045 AA20 BA10 CA42 DA65 EA24  
GA10